

新型コロナウイルス 病原体検出マニュアルについて

国立感染症研究所ウイルス第3部
白戸憲也



開発の経緯

病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1

令和2年3月19日

- ◇ 本マニュアル Ver.2.3(令和2年2月5日)について:HP 公開用に多少の文言の修正や追加はありますが、基本的な検査内容は、地方衛生研究所にお配りした「2019-nCoV 検査マニュアル Ver.2.3」と同じになっております。
- ◇ Ver.2.3(令和2年2月5日)から、Ver.2.4(令和2年2月13日)にかけての変更点。キット比較についての情報を追記いたしましたが、検査法の内容についての変更はありません。
- ◇ Ver.2.4(令和2年2月13日)から、Ver.2.5(令和2年2月15日)にかけての変更点。(1)市販キットの製品番号の修正。(2)喀痰処理法の追記。検査方法についての変更はありません。
- ◇ Ver.2.5(令和2年2月15日)から、Ver.2.6(令和2年2月17日)にかけての変更点。(1)陽性基準の記載内容の修正と追加記載。(2)問い合わせ先の記載の削除。
- ◇ Ver.2.6(令和2年2月17日)から、Ver.2.7(令和2年2月23日)にかけての変更点。BSL2+についての説明などの追加。引用文献(Shirato et al. 2020 JJID)の追加。
- ◇ Ver.2.7(令和2年2月25日)から、Ver.2.8(令和2年3月4日)にかけての変更点。リアルタイム RT-PCR 法に利用できる反応試薬の追加。リアルタイム RT-PCR 法に用いる試薬、機器に関する記載の追加。
- ◇ Ver.2.8(令和2年3月4日)から、Ver.2.9(令和2年3月18日)にかけての変更点。リアルタイム RT-PCR 法に利用できる反応試薬、機器について別添2に記載(それに伴いキット間の比較についての記載の削除)。執筆者一覧を、国立感染症研究所作成に変更。陽性コントロールについての記載の修正。

◇ Ver.2.9(令和2年3月18日)から、Ver.2.9.1(令和2年3月19日)にかけての変更点。別添2の変更

2020年(令和2年)

1月

January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13 成人の日	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1

THE WALL STREET JOURNAL.

English Edition ▾ | May 8, 2020 | Print Edition | Video

Home [World](#) [U.S.](#) [Politics](#) [Economy](#) [Business](#) [Tech](#) [Markets](#) [Opinion](#) [Life & Arts](#) [Real Estate](#) [WSJ](#)

[WORLD](#) | [ASIA](#) | [CHINA](#)

New Virus Discovered by Chinese Scientists Investigating Pneumonia Outbreak

Latest tally of people sickened in Wuhan is 59, with seven in critical condition

By [Natasha Khan](#)

Updated Jan. 8, 2020 8:30 pm ET

 PRINT  TEXT

HONG KONG—Chinese scientists investigating a mystery illness that has sickened dozens in central China have discovered a new strain of coronavirus, a development that will test the country's upgraded capabilities for dealing with unfamiliar infectious diseases.

The novel coronavirus was genetically sequenced from a sample from one patient and subsequently found in some of the others affected in the city of Wuhan, people familiar with the findings said. Chinese authorities haven't concluded that the strain is the underlying...

RECOMMENDED VIDEOS

1. [Coronavirus Update: California Borrows Federal Cash, United Plans Cuts](#)
2. [Swedish Businesses Remained Open, but Are Suffering Too](#)
3. [Saudi Arabia's \\$500 Billion Megacity Dream Clashes With Reality](#)

2020年(令和2年)

1月

January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13 成人の日	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1

Novel 2019 coronavirus genome

Novel 2019 coronavirus



edward_holmes

6 Jan 11

10th January 2020

This posting is communicated by Edward C. Holmes, University of Sydney on behalf of the consortium led by Professor Yong-Zhen Zhang, Fudan University, Shanghai

The Shanghai Public Health Clinical Center & School of Public Health, in collaboration with the Central Hospital of Wuhan, Huazhong University of Science and Technology, the Wuhan Center for Disease Control and Prevention, the National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control, and the University of Sydney, Sydney, Australia is releasing a coronavirus genome from a case of a respiratory disease from the Wuhan outbreak. The sequence has also been deposited on GenBank ([accession MN908947](#) 20.5k) and will be released as soon as possible.

Update: [This genome is now available on GenBank and an updated version has been posted](#) 20.5k.

Disclaimer:

Please feel free to download, share, use, and analyze this data. We ask that you communicate with us if you wish to publish results that use these data in a journal. If you have any other questions –then please also contact us directly.

Professor Yong-Zhen Zhang,
Shanghai Public Health Clinical Center & School of Public Health,
Fudan University,
Shanghai, China.

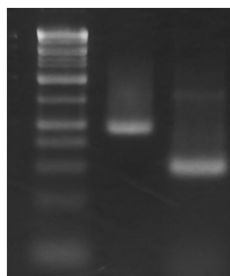
[email: zhangyongzhen@shphc.org.cn](mailto:zhangyongzhen@shphc.org.cn)

ウイルスのシーケンス発表

早急にセットアップできるウイルス検査法

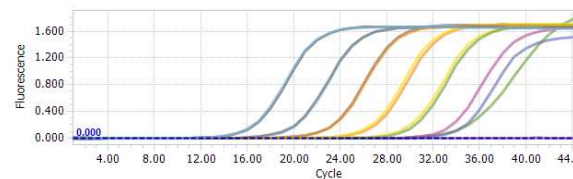
遺伝子検出法

Conventional PCR (コンベ)



プライマーだけ

Real-time PCR (リアルタイム)



プライマーと**蛍光プローブ**

Conventional PCR (コンベ)

SARS-CoV流行時にCDCで開発された
corona共通プライマー

Name	direction	sequence (5' to 3')	Expect (bp)
IN-6	sense	GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA	440
IN-7	antisense	CCATCATCAGATAGAATCATCATA	
IN7hemi	antisense	ATCAGATAGAATCATCATAGAGA	435
No. Name	direction	sequence (5' to 3')	Expect (bp)
1 NIID_WH-1_F501	sense	TTCGGATGCTCGAACTGCACC	413
NIID_WH-1_R913	antisense	CTTTACCAGCACGTGCTAGAAGG	
2 NIID_WH-1_F2396	sense	TAGGTGAAACATTTGTCACGCACTC	347
NIID_WH-1_R2742	antisense	TGGTGCACCCGCTTTGAGTGTG	
3 NIID_WH-1_F5822	sense	GCATAGACGGTGCTTTACTTACAAAGTC	568
NIID_WH-1_R6389	antisense	ATTCCCTGCGCGTCCCTCTGAC	
4 NIID_WH-1_F9436	sense	ATTGTAGCTATCGTAGTAACATGCC	548
NIID_WH-1_R9983	antisense	AGATGACAACAAGCAGCTTCTCTG	
5 NIID_WH-1_F11625	sense	AGTTTATGTTTCTTAGGCTATTTTGTAC	361
NIID_WH-1_R11985	antisense	AGCTAAGAGAATGTCATTGTGTAA C	
6 NIID_WH-1_F23061	sense	ATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTG	685
NIID_WH-1_R23650	antisense	ATTGACTAGCTACACTACGTGCC	
7 NIID_WH-1_F24855		AGGTGTCTTTGTTTCAAATGGCACACA	485
NIID_WH-1_R25339		AGCAGGATCCACAAGAACAACAG	
8 NIID_WH-1_F28659		TGGTGCTAACAAAGACGGCA	307
NIID_WH-1_R28965		GTCAAGCAGCAGCAAAGCAA	
9 NIID_WH-1_F29062		CCTCGGCAAAAACGTACTGC	386
NIID_WH-1_R29447		TGTCTCTGCGGTAAGGCTTG	

とりえあず急場しのぎのコンベ用
プライマーを即日発注

Conventional PCR (コンベ)

2020年(令和2年) **1月** January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13 成人の日	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26						1

14日の午前にプライマー到着
14日の夜に最初の行政検査検体が到着

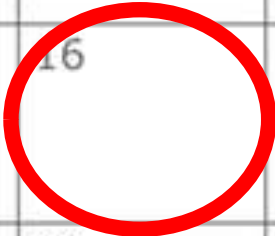
Conventional PCR (コンベ)

1月

2020年(令和2年)

January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13 成人の日	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1



国内1例目として報告

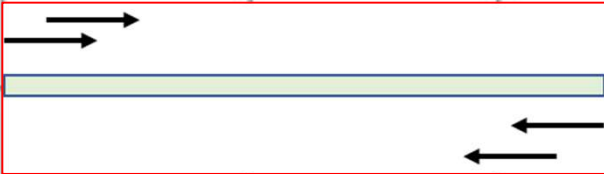
Conventional PCR (コンベ)

2020年(令和2年) 1月 January

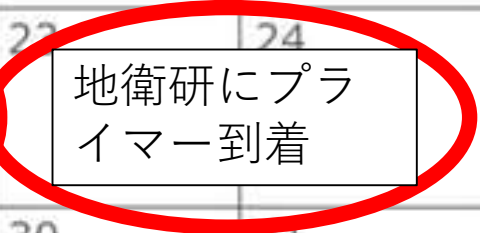
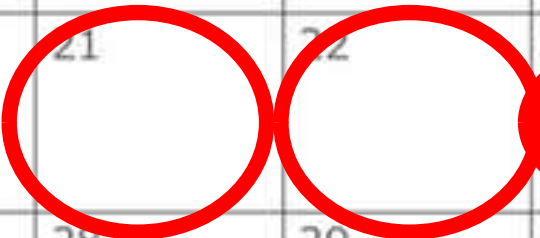
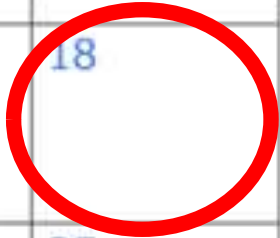
日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1



Hemi nested に切り替え
→非特異多く失敗



Nestedに切り替え→安定



地衛研にプライマー到着

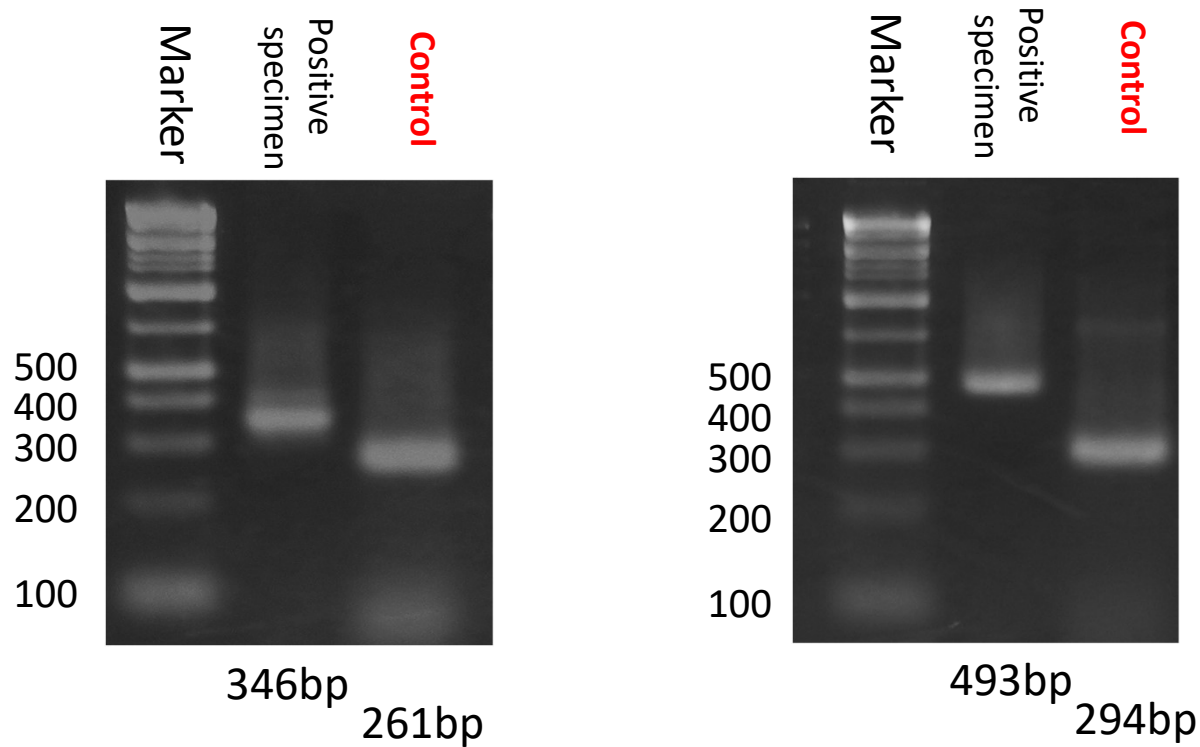
検査要望多数のため、とりあえずコンベ配布決定
→マニュアル作成 プライマー発注
コンベ用のコントロールも 作製することに決定
(リアルタイムがメインなので作る気がなかった)

Conventional PCR (コソベ)

Nested RT-PCR				
Application	Name	Direction	Sequence (5' to 3')	Expected size (bp)
Set for ORF1a				
1 st PCR	NIID_WH-1_F501	Sense	TTCGGATGCTCGAACTGCACC	413
1 st PCR	NIID_WH-1_R913	Antisense	CTTTACCAGCACGTGCTAGAAGG	
2 nd PCR	NIID_WH-1_F509	Sense	CTCGAACTGCACCTCATGG	346
2 nd PCR	NIID_WH-1_R854	Antisense	CAGAAGTTGTTATCGACATAGC	
Sequencing	NIID_WH-1_Seq_F519	Sense	ACCTCATGGTCATGTTATGG	
Sequencing	NIID_WH-1_Seq_R840	Antisense	GACATAGCGAGTGTATGCC	
Set for Spike protein				
1 st PCR	WuhanCoV-spk1-f	Sense	TTGGCAAATTC AAGACTCACTTT	547
1 st PCR	WuhanCoV-spk2-r	Antisense	TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGT G	
2 nd PCR	NIID_WH-1_F24381	Sense	TCAAGACTCACTTTCTTCCAC	493
2 nd PCR	NIID_WH-1_R24873	Antisense	ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC	
Sequencing	NIID_WH-1_Seq_F24383	Sense	AAGACTCACTTTCTTCCACAG	
Sequencing	NIID_WH-1_Seq_R24865	Antisense	CAAAGACACCTTCACGAGG	

検出実績のある**No1**セットと感染病理部設計セットを採用。
Nestプライマーとシークエンスプライマーを設定して**WHO**に報告

2019-nCoV nested PCR 参考泳動図



国内に存在しないはずであるMERS-CoVの配列にプライマー配列を足しただけ。

プライマーセットの組み合わせがあっているかどうかのコントロールにはなる。

コンタミしてもバンド大きさが違うので判別可能

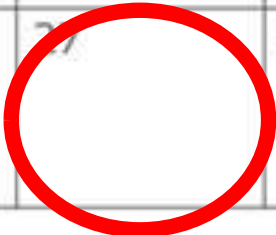
Conventional PCR (コンベ)

2020年(令和2年)

1月

January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元日	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13 成人の日	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1



コンベコントロール発送

海外から引き合いがいくつか

Real-time RT-PCR

2020年(令和2年) **1月** January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13 成人の日	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1

WHO法(リアルタイムRT-PCR)発表

Real-time RT-PCR

WHO法

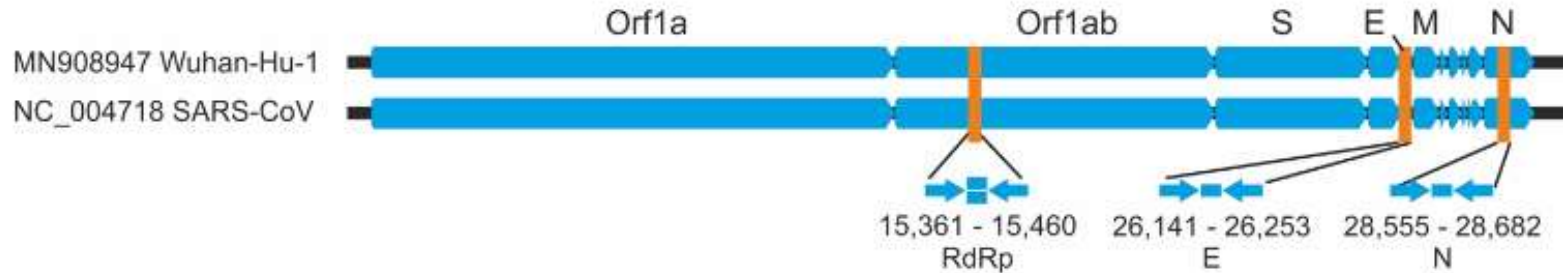


Figure 1 relative positions of amplicon targets on SARS-CoV ad Wuhan-CoV genome. N: nucleocapsid; ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase. Numbers below amplicon are genome positions according to SARS-CoV, NC_004718.

MERS-CoVのWHO法セット(ORF1a & upE)の設計者である Dr. Corman がSARS-like beta-coronavirus共通セットとしてすでに報告していたセット(3つ)がSARS-CoV-2も検出できることが発表されたので即発注 (彼らの発表を待っていた)

一応予備でN領域で2組独自に設計して発注していた。
N set no.2 (N2)、 N set no.3(N3)

Real-time RT-PCR

陽性コントロール兼評価用テンプレート作製

N set no.2 (N2)

```
GGGCAGACGTGGTCCAGAACAAACCCAAGGAAATTTTGGGGA  
CCAGGAACTAATCAGACGGATCCAGCTAGCGCATTGGATCTCGC  
AAATTGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAAATG  
TCGCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGTTGA  
CCTACACAGCTGCCATCAAATTGGATGACAAAGATCCAAATTC  
AAAGATCAAGTCATTTTGCT  
237 base
```

Forward **Probe** **Reverse** **PC check (VIC)** **BamH I**

ウイルス自体がないため、評価のためのテンプレートを作製するとともに、セットが稼働するようであれば、即コントロールとして使えるように、コンタミチェック配列を仕込んだものを設計。

WHO法と併せて5組分について、これらも見込みで作製用長鎖プライマーを発注。

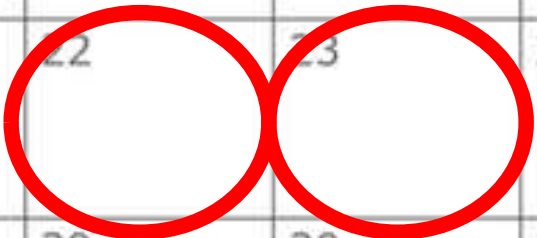
Real-time RT-PCR

2020年(令和2年) **1月** January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12						
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1

発注していたNIIDリアルタイムRT-PCR用セット(N2、N3)が到着、即 validate

N2セットが良好だったので即実践投入
WHOセットが到着したのでValidate



配布用としてWHO法(E、N)を見込み発注
国からの依頼としてかなり突貫で無理して
言ってお願ひした。

Real-time RT-PCR

感染研法 N2セット

Primer	Sequence (5' to 3')	Position (MN908947)	Concentration
NIID_2019-nCoV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	29142-29161	500 nM
NIID_2019-nCoV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	29299-29280	700 nM
NIID_2019-nCoV_N_P2	FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ	29239-29258	200 nM

▪ Detection of second case of 2019-nCoV infection in Japan[←]

¹Naganori Nao, ¹Kazuya Shirato, ²Harutaka Katano, ¹Shutoku Matsuyama, and ¹Makoto Takeda[←]

¹Laboratory of Acute Viral Respiratory Infections and Cytokines, Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, 208-0011 Tokyo, Japan: ²Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 164-8640, Japan[←]

←

Method & Results[←]

1) Nested RT-PCR[←]

Total RNA was extracted from pharyngeal swab using QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) following manufacture's instruction. First strand cDNA was synthesized using Super Script IV Reverse Transcriptase (Thermo) with random primer (Thermo) and oligodT primer (Thermo). PCR reaction was performed using Quick Taq HS Dyemix (TOYOBO, Japan) using two 2019-nCoV specific primers (Table 1). The PCR condition was as follows: 94°C for 1 min; 40 cycles of 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec, and 68°C for 1 min. After 1st PCR, nested PCR was performed using 2nd PCR primers and 1μL of 1st PCR product under the same condition as 1st PCR. The primer concentrations were 400nM for all. DDW was used as negative control. The amplicons were visualized by 2%

即WHOに報告

Real-time RT-PCR

WHOアッセイ

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence ^a	Concentration ^b
RdRP gene	RdRp	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARsR-P2		Use 100 nM per reaction and mix with P1 c for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV.
	RdRp	...CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATG...	Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, CoV and bat-SARS-related CoVs.
	RdRp_SARsR-R	CARATGTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction and mix with P2
E gene	E_Sarbeco_P	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCC...	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 200 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nm per reaction

RdRP → 感度が低すぎて使い物にならない
 E → 感度はかなり高いが非特異反応もかなり出る **最適化している時間がない**
 N → 感度はやや低いが調べる限り安定している → 採用

Real-time RT-PCR

2020年(令和2年) **1月** January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13 成人の日	14	15	16	17	18
			22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1

27

N2セットとNセットのコントロールを先んじて配布(コンベと同時)
N2セットも急遽配布用を発注

Real-time RT-PCR

2020年(令和2年) **1月** January

日	月	火	水	木	金	土
29	30	31	1 元旦	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13 成人の日	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	1

地衛研・検疫到着



リアルタイムセット出荷

Real-time RT-PCR

2020年(令和2年) 2月 February

日	月	火	水	木	金	土
27	28	29	30	30	31	1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11 建国記念日	12	13	14	15
16						
23	24	25	26	27	28	29

陽性コントロールVer1が動かない。
各方面からの大量のクレーム (特に検疫所から)
少なくとも東京大阪が動いているのは朗報(と思っていた。)

指定感染症に

Real-time RT-PCR

N set no.2 (N2)

GGGCAGACGTGGTCCAGAACAAACCCAAGG**AAATTTTGGGGACCAGGAAC**TAATCAGAC
GGATCCAGCTAGCGCATTGGATCTCGCAAATTGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGTTC
TTCGGA**ATGTCGCGCATTGGCATGGA**AGTCACACCTTCGGGAACGTG**GTTGACCTACACA**
GCTGCCATCAAATTGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAA
GCATATTGACGCATACAAAACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAAAAGAAGAA
GGCTGATGAAACTCAAGCCTTACCGCAGAGACAG

337 base

Forward **Probe** **Reverse** **PC check (VIC)** **BamH I**

元々

もとが230ベースくらいで短いので、Megascript kitでの転写後の Lithium Chloride Precipitation効率や反応性などにも影響すると考えられたので100ベースほど伸ばす予定だった。

→突貫で作製

Real-time RT-PCR



Real-time RT-PCR

2020年(令和2年) 2月 February

日	月	火	水	木	金	土
27	28	29	30	30	31	1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11 建国記念日	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23 天皇誕生日	24 振替休日	25	26	27	28	29

横浜検疫所での検査が始まっていた



[Jpn J Infect Dis.](#) 2020 Feb 18. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.061. [Epub ahead of print]

Development of Genetic Diagnostic Methods for Novel Coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan.

[Shirato K](#)¹, [Nao N](#)¹, [Katano H](#)², [Takayama I](#)³, [Saito S](#)³, [Kato F](#)¹, [Kato H](#)¹, [Sakata M](#)¹, [Nakatsu Y](#)¹, [Mori Y](#)¹, [Kageyama T](#)³, [Matsuyama S](#)¹, [Takeda M](#)¹.

NIID-N2セットとCDC-N2セットの位置関係

NIID-N2

TTTTGGCAGACGTGGTCCAGAACAAACCCAAGG **Forward**
AAATTTTGGGG

ACCAGGAACTAATCAGACAAGGAACTGATTACAAACATTGGCCGC

CDC-N2 Forward

Probe

AAATTGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGA**ATGT**

Probe

CGCGCATTGGCATGGAAAGTCACACCTTCGGGAACGTG**GTTGACC**

Reverse

Reverse

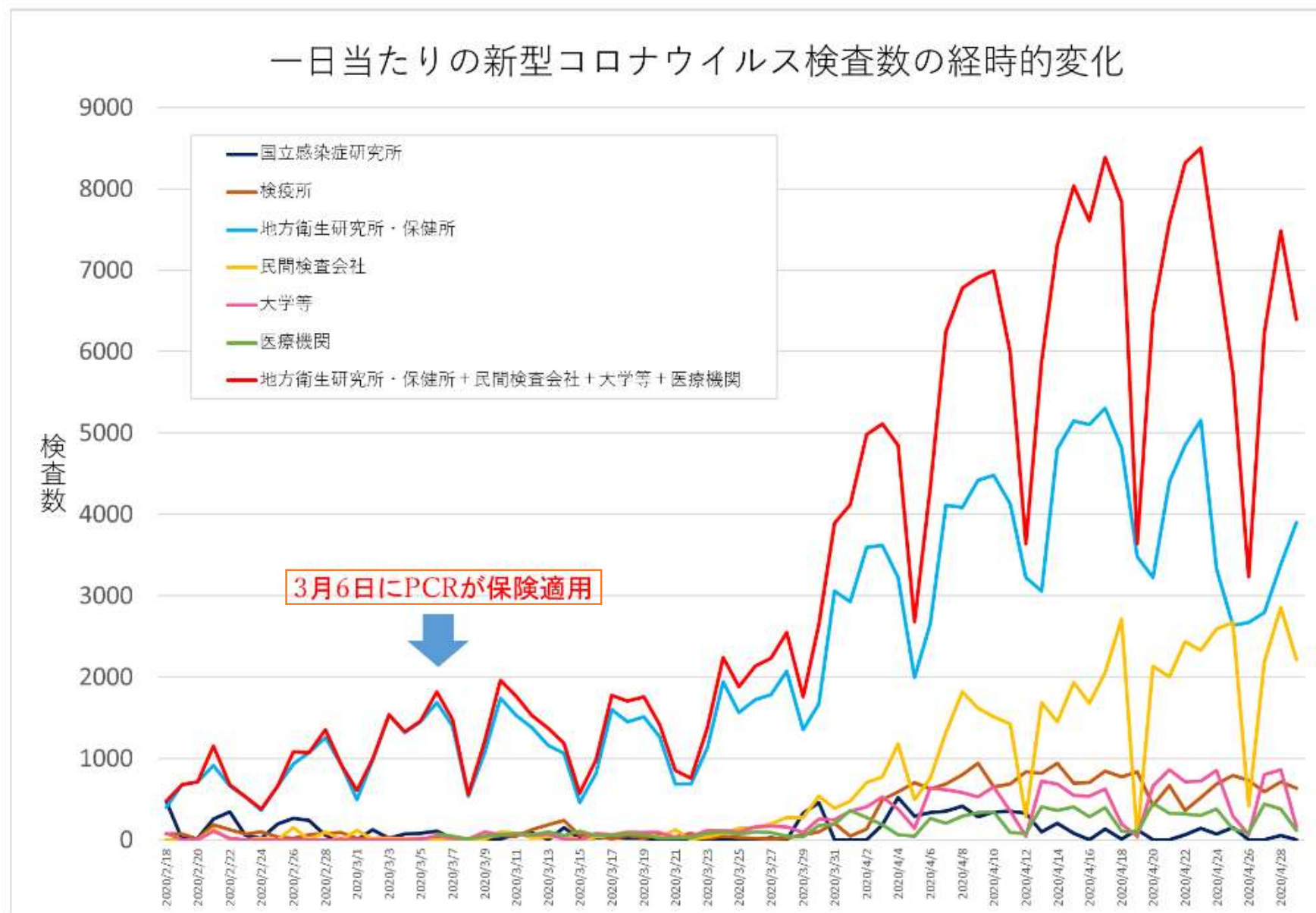
TACACAGGTGCCATCAAATTGGATGACAAAGATCCAAATTTCA

↓N2コントロールはコンタミチェック配列でCDCのN2はFがないので使えない

GGCAGACGTGGTCCAGAACAAACCCAAGG **AAATTTTGGGGACCAGGAAC**TAATCAGAC
GGATCCAGCTAGCGCATTGGATCTCGCAAATTGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGTTC
TTCGGA**ATGTCGCGCATTGGCATGGA**AAGTCACACCTTCGGGAACGTG**GTTGACCTACACA**
GCTGCCATCAAATTGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAA
GCATATTGACGCATACAAAACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAAAAGAAGAA
GGCTGATGAAACTCAAGCCTTACCGCAGAGACAG

337 base

【図5 一日当たりの新型コロナウイルス検査数の経時的変化】



※厚生労働省新型コロナウイルス感染症対策推進本部クラスター対策班（検査班データ）

以下、抜粋資料

厚生労働省保険局医療課長（公印省略）

厚生労働省保険局歯科医療管理官（公印省略）

保医発 0305 第 1 号 令和 2 年 3 月 5 日

地方厚生(支)局医療課長 都道府県民生主管部(局)

国民健康保険主管課(部)長 殿 都道府県後期高齢者医療主管部(局)

後期高齢者医療主管課(部)長

診療報酬の算定方法の一部改正に伴う実施上の留意事項について

標記については、本日、「診療報酬の算定方法の一部を改正する件」（令和 2 年厚生労働省告示第 57 号）等が公布され、令和 2 年 4 月 1 日より適用されることとなったところであるが、実施に伴う留意事項は、内科診療報酬点数表については別添 1、歯科診療報酬点数表については別添 2 及び調剤 報酬点数表については別添 3 のとおりであるので、その取扱いに遺漏のないよう貴管下の保険医療機関及び審査支払機関に対し、周知徹底を図られたい。

別添 1

内科診療報酬点数表に関する事項

D023 微生物核酸同定・定量検査

(17) SARS-CoV-2(新型コロナウイルスをいう。以下同じ。)核酸検出は、喀痰、気道吸引液、肺胞洗浄液、咽頭拭い液、鼻腔吸引液又は鼻腔拭い液からの検体を用いて、**国立感染症研究所が作成した「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」に記載されたもの若しくはそれに準じたもの又は体外診断用医薬品のうち、使用目的又は効果として、SARS-CoV-2 の検出(COVID-19 の診断又は診断の補助)を目的として薬事承認又は認証を得ているものにより、COVID-19(新型コロナウイルス感染症をいう。以下同じ。)の患者であることが疑われる者に対し COVID-19 の診断を目的として行った場合又は COVID-19 の治療を目的として入院している者に対し退院可能かどうかの判断を目的として実施した場合に限り算定できる。ただし、感染症の発生の状況、動向及び原因を明らかにするための積極的疫学調査を目的として実施した場合は算定できない。**



別添 2

2019-nCoV 検出に利用できることが確認できている
反応試薬、機器の組み合わせ

反応試薬	使用機器
Thermo Fisher Scientific	
QuantiTect Probe RT-PCR kit (Cat# 204443 等)	Roche LightCycler (96, 480, 480II) ABI 7500 シリーズ ABI QuantStudio シリーズ ABI StepOne シリーズ Bio-Rad CFX96 Touch シリーズ Bio-Rad CFX96 Touch Deep well シリーズ
AgPath-ID One-step RT-PCR Reagents (Cat# AM1005 等)	Roche LightCycler (96, 480, 480II) ABI 7500 シリーズ ABI QuantStudio シリーズ ABI StepOne シリーズ
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Cat# 4444432 等)	Roche LightCycler (96, 480, 480II) ABI 7500 シリーズ ABI QuantStudio シリーズ ABI StepOne シリーズ
タカラバイオ	
One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Cat# RR061A 等)	Roche LightCycler 96, 480II ABI 7500 シリーズ

QuantiTect以外保険適用
しません、となり、各社
からのクレーム。
急遽別添 2 で整理。

それぞれ独自に陽性コン
トロールを使った評価
データを採取し、提出し
てきたものについて記載
したのみ。

我々のところに全メー
カーのリアルタイムPCR
機器があり、すべての試
薬を評価したわけではな
い。

研究用試薬
についても保険適用
感染研ルート

臨床検体を用いた評価結果が取得された
2019-nCoV 遺伝子検査方法について

厚生労働省健康局結核感染症課
国立感染症研究所

2020年10月23日版

新型コロナウイルス感染症の発生状況を踏まえ、その緊急性に鑑み、精度や汎用性のある検査方法を普及させる観点から、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに基づく方法(以下、「感染研法」という。)とメーカー等が提案する遺伝子検査方法の比較が行われた。その結果を以下のとおり情報提供する。

1. 国立感染症研究所が用意した臨床検体を用い、感染研法との一定の一致率を示した遺伝子検査方法

国立感染症研究所が用意した臨床検体(陽性10検体、陰性15検体)を用い、感染研法との陽性一致率及び陰性一致率を求めた結果が厚生労働省に提出された。そのうち、陽性一致率及び陰性一致率ともに90%以上を示した結果は、現時点において、以下のとおりであった。

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV-17-current.pdf>

厚生労働省保険局医療課長（公印省略）
厚生労働省保険局歯科医療管理官（公印省略）
保医発 0602 第 2 号 令和 2 年 6 月 2 日

地方厚生(支)局医療課長
都道府県民生主管部(局)
国民健康保険主管課(部)長
都道府県後期高齢者医療主管部(局)
後期高齢者医療主管課(部)長

検査料の点数の取扱いについて

標記について、「診療報酬の算定方法の一部改正に伴う実施上の留意事項について」（令和 2 年 3 月 5 日付け保医発 0305 第 1 号）を下記のとおり改正し、令和 2 年 6 月 2 日から適用するので、貴管下の保険医療機関、審査支払機関等に対して周知徹底をお願いいたします。

記

- 別添 1 第 2 章第 3 部第 1 節第 1 款 D023(17)中「喀痰、気道吸引液、肺胞洗浄液、咽頭拭い液、鼻腔吸引液又は鼻腔拭い液からの検体を用いて、」を削る。
- D023(17)中「ただし、感染症の発生の状況、動向及び原因を明らかにするための積極的疫学調査を目的として実施した場合は算定できない。」の下に「なお、検査に用いる検体については、国立感染症研究所が作成した「2019-nCoV(新型コロナウイルス)感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」を参照すること。」を加える。
- D023(17)中「「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律における新型コロナウイルス感染症患者の退院及び就業制限の取扱いについて(一部改正)」(令和 2 年 2 月 18 日健感発 0218 第 3 号)」を「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律における新型コロナウイルス感染症患者の退院及び就業制限の取扱いについて(一部改正)」（令和 2 年 5 月 29 日健感発 0529 第 1 号）」に改める。

改正後	現行
別添 1 医科診療報酬点数表に関する事項 第 1 章 (略) 第 2 章 持掲診療料 第 1 部・第 2 部 (略) 第 3 部 検査 第 1 節 検体検査料 第 1 款 検体検査実施料 D000~D022 (略) D023 微生物核酸同定・定量検査 (1)~(16) (略) (17) SARS-CoV-2 核酸検出は、 <u>国立感染症研究所が作成した「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」に記載されたもの</u> 若しくはそれに準じたもの又は体外診断用医薬品のうち、使用目的又は効果として、SARS-CoV-2 の検出(COVID-19 の診断又は診断の補助)を目的として薬事承認又は認証を得ているものにより、COVID-19 の	別添 1 医科診療報酬点数表に関する事項 第 1 章 (略) 第 2 章 持掲診療料 第 1 部・第 2 部 (略) 第 3 部 検査 第 1 節 検体検査料 第 1 款 検体検査実施料 D000~D022 (略) D023 微生物核酸同定・定量検査 (1)~(16) (略) (17) SARS-CoV-2 核酸検出は、 <u>喀痰、気道吸引液、肺胞洗浄液、咽頭拭い液、鼻腔吸引液又は鼻腔拭い液からの検体を用いて、国立感染症研究所が作成した「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」に記載されたもの</u> 若しくはそれに準じたもの又は体外診断用医薬品のうち、使用目的又は効果として、SARS-CoV-2 の検出

通知の中に検出マニュアルが組み込まれてしまい、我々の手から離れてしまった。

変異により、N2セットが対応できなくなったときに備え、感度が同程度の別系統のセットを掲載する必要があり、用意していた。

Berlin, Jan 17th, 2020

Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR

-Protocol and preliminary evaluation as of Jan 17, 2020-

Victor Corman, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Christian Drosten
Charité Virology, Berlin, Germany

Olfert Landt, Tib-Molbiol, Berlin, Germany

Marion Koopmans
Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

Maria Zambon
Public Health England, London

Additional advice by Malik Peiris, University of Hong Kong

Users looking for a workflow protocol consult the last three pages of this document

Contact: christian.drosten@charite.de
<https://virologie-ccm.charite.de/en/>

Positive control material is available from Charité, Berlin, via EVAg
(<https://www.european-virus-archive.com/>).

This is document Version 2.

Changes against Version 1 (Jan 13, 2019): Workflow protocols included, N gene assay removed, data for single probe versions of RdRp assay added; information on availability of controls updated.

WHOマニュアルからはN
セットは早々に削除されて
いる。

N2と同感度で別のセットと
入れ替える予定で6月には
改訂版を用意していた。

しかしVer2.9.1が教典となっ
てしまい、改定できなくな
った。



研究用試薬
についても保険適用
感染研ルート
→9月30日をもって
受付を終了
以後は体外診断用医薬
品の承認のみ

臨床検体を用いた評価結果が取得された
2019-nCoV 遺伝子検査方法について

厚生労働省健康局結核感染症課
国立感染症研究所

2020年10月23日版

新型コロナウイルス感染症の発生状況を踏まえ、その緊急性に鑑み、精度や汎用性のある検査方法を普及させる観点から、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに基づく方法(以下、「感染研法」という。)とメーカー等が提案する遺伝子検査方法の比較が行われた。その結果を以下のとおり情報提供する。

1. 国立感染症研究所が用意した臨床検体を用い、感染研法との一定の一致率を示した遺伝子検査方法

国立感染症研究所が用意した臨床検体(陽性10検体、陰性15検体)を用い、感染研法との陽性一致率及び陰性一致率を求めた結果が厚生労働省に提出された。そのうち、陽性一致率及び陰性一致率ともに90%以上を示した結果は、現時点において、以下のとおりであった。

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV-17-current.pdf>

お知らせ

- ▶ 採用情報
- ▶ 調達情報
- ▶ 情報公開
- ▶ 公開講座・研修
- ▶ その他

感染症情報

- ▶ 疾患名で探す
- ▶ 感染源や特徴で探す
- ▶ 予防接種情報
- ▶ 災害と感染症

研究・検査・病原体管理

病原体検出マニュアル > 新型コロナウイルス感染症



PUBLISHED: 2020年4月16日

新型コロナウイルス感染症に関するレファレンス業務関連文書

- [病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1](#) → Ver 2.9.1 が教典であることは変わらない
- [検査法の運用について\(第3版\)](#)
- [「感染研・地衛研専用」SARS-CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル](#)

Ver 2.9.1 を貶めてはならない
「感染研・地衛研専用」であることを明記して区別

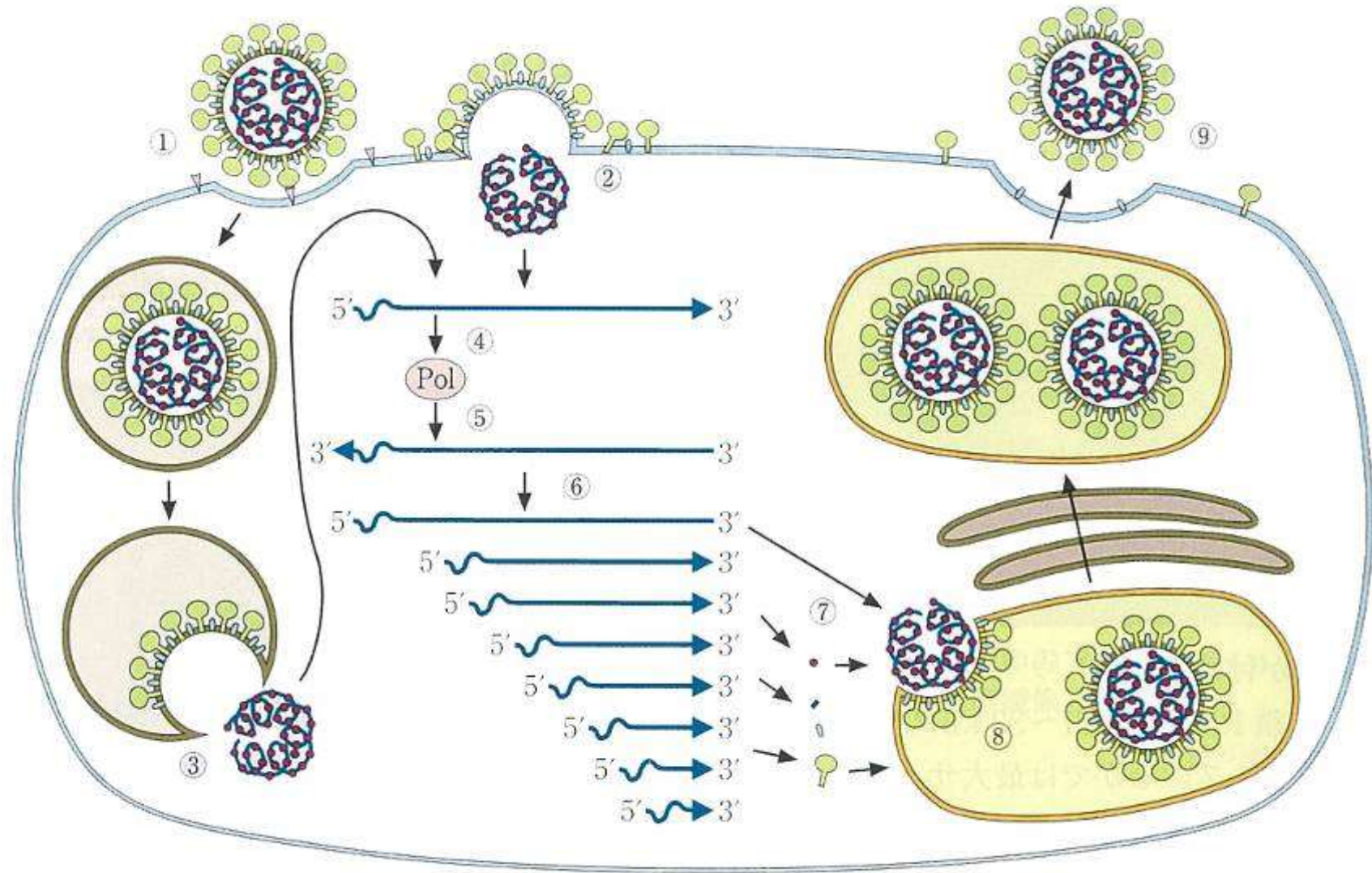
12月10日にアップ

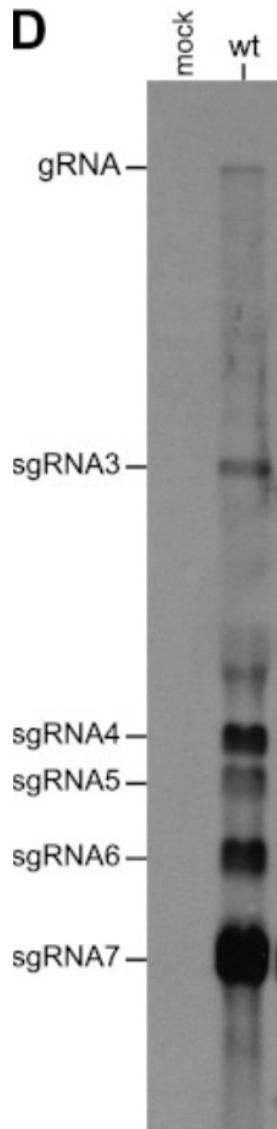
SARS-CoV-2検出マニュアルVer.1

病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver.4

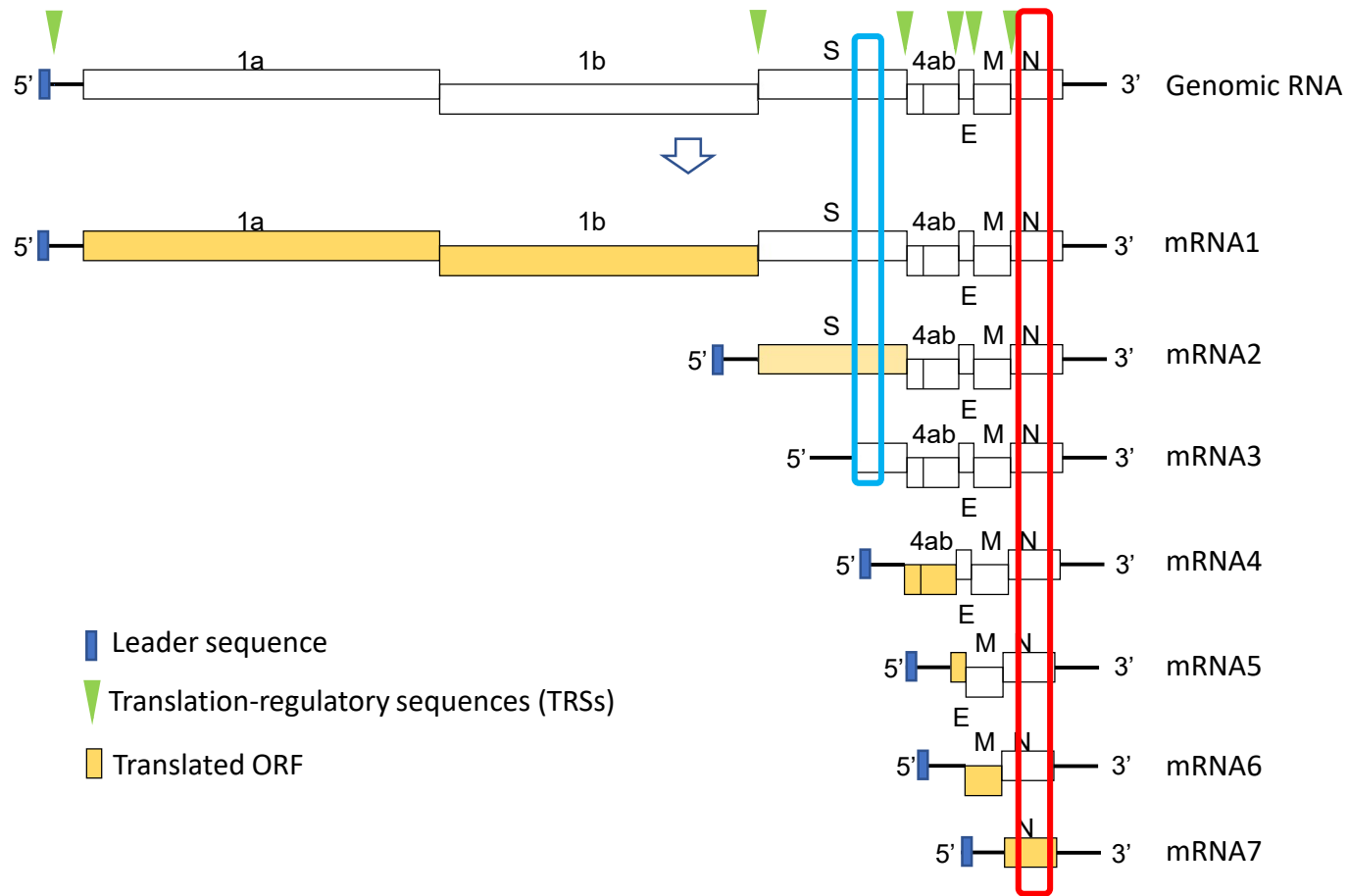
- ・ NセットではなくS2セットを記載
- ・ ウイルス分離法を追加

一般的なコロナウイルスのライフサイクル



D

一般的なコロナウイルスのゲノム構造 (HCoV-229E)

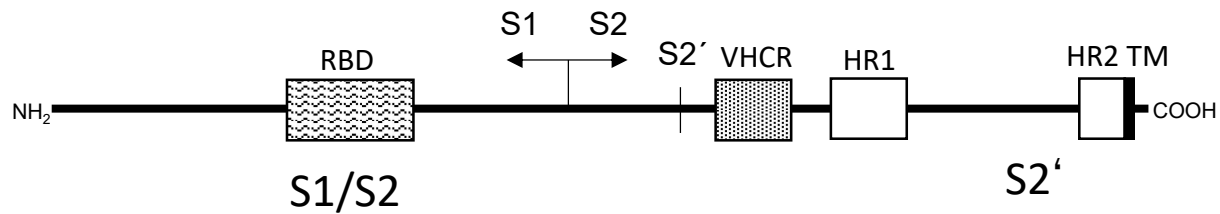


J Gen Virol . 1990 May;71 (Pt 5):1065-73. 参照

マウス肝炎ウイルス(MHV)
感染細胞のNorthan blot (3' end probe)

Journal of Virology, 28 Feb 2013, 87(9):5182-5192

ウイルス複製を見つけやすいと考えられるため、
Nで設計されることが多い



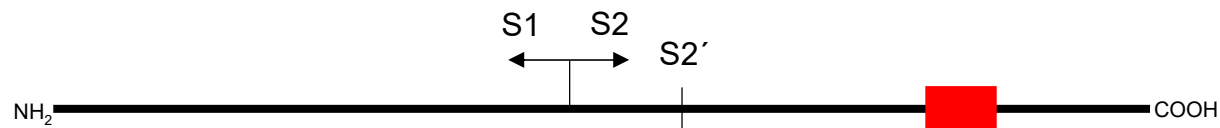
1. HCoV-229E_VR740	---	S	I	I	A	V	Q	P	R	N	V	S	Y	D	S	---	V			
2. HCoV-OC43_VR1558	---	S	-	K	N	R	R	S	R	G	A	I	T	T	G	Y	R	F		
3. HCoV-NL63_NC_005831	---	S	L	I	P	V	R	P	R	N	S	S	D	N	G	---	I			
4. HCoV-HKU1_Tokyo/SGH-15-2014	P	S	S	S	S	S	R	R	K	R	R	S	I	S	A	S	-	Y	R	F
5. SARS-CoV_Fr1	---	H	T	V	S	L	L	R	S	T	S	Q	K	S	---	I				
6. MERS-CoV_EMC	P	-	S	T	L	T	P	R	S	V	R	S	V	P	G	E	-	M	R	L
7. SARS-CoV-2_WH1	-	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	---	I	

P	S	L	P	T	S	---	---	G	S	R	V	A	G	R	S	A	I	E	D	I	L	F	S	K	L	V	T	S	G	L	G	T	V	D	A					
F	S	P	V	L	G	Q	L	G	S	E	Q	S	K	A	S	S	R	S	A	I	E	D	L	L	F	D	K	V	K	L	S	D	V	G	F	V	E	A		
P	Q	R	N	I	R	---	---	S	S	R	I	A	G	R	S	A	L	E	D	L	L	F	S	K	V	V	T	S	G	L	G	T	V	D	V					
F	K	S	L	V	G	Q	L	G	P	H	G	G	-	S	S	S	R	S	F	F	E	D	L	L	F	D	K	V	K	L	S	D	V	G	F	V	E	A		
P	D	P	L	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---	P	T	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D	A	G	F	M	K	Q		
P	V	S	I	S	---	---	---	---	---	---	---	---	T	G	S	R	S	A	R	S	A	I	E	D	L	L	F	D	K	V	T	I	A	D	P	G	Y	M	Q	G
P	D	P	S	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D	A	G	F	I	K	Q		

VHCR
Putative fusion peptide

受容体の結合、中和に関与しており、極めて変異しやすい

膜融合を誘導するための構造変化に関与しており、比較的安定している。



S2 set

ATGTCCTTCCCT **CAGTCAGCACCTCATGGTGT**AGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTC
 CCTGCACAAGAAAAGAACTTCACAAC**TGCTCCTGCCATTTGTCATGATGG**AAAAG
 CACACTTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGTT**TCAAATGGCACACACTGGTT**TGTAACA

S2セットの感度

Origin of isolate	Name of isolate	Sensitivity (copies/reaction)	
		NIID-N2 set	NIID-S2 set
Wuhan	AI/I-004/2020	7.9	4.4
	TY/WK-521/2020	1.4	1.4
	TY/WK-501/2020	1.4	4.4
	Wuhan-total	2.5	3.0
Europe/America	QH-328-037	1.7	7.9
	QH-329-073	3.7	1.7
	QH-406-006	3.7	3.7
	QH-406-007	3.7	1.7
	Euro-total	3.0	3.0
Tokyo	TY5-329	4.4	7.9
	TY5-332	2.5	4.4
	TY5-337	4.4	5.4
	TY5-339	1.4	7.9
	TY5-340	1.4	4.4
	Tokyo-total	2.5	5.8

N2に匹敵

S2 セットの Specificity

	Name of isolate	Amount/reaction	NIID- N2 set	NIID S2 se						
paramyxoviruses										
	SARS-CoV-2	Japan/TY/WK-521/2020	2.5×10 ⁵ copies	+	+	parainfluenza virus, RSV)	A2	2.5 ×10 ⁶ copies	-	-
	SARS-CoV	Frankfurt-1	5×10 ⁴ copies	-	-		CH/18537	4.8×10 ⁵ copies	-	-
	MERS-CoV	EMC	2.5×10 ⁵ copies	-	-		B1	2.5 ×10 ⁶ copies	-	-
human coronavirus (HCoV)							A/NIID/2347/14	5 ×10 ⁴ copies	-	-
	HCoV-229E	VR-740	1.8×10 ⁹ copies	-	-		A/NIID/2367/14	5 ×10 ⁴ copies	-	-
		Sendai-H/1121/04	4.9×10 ⁶ copies	-	-		A/NIID/2470/14	5 ×10 ⁴ copies	-	-
		Niigata/01/08	2×10 ⁵ copies	-	-		B/NIID/2472/14	5 ×10 ⁴ copies	-	-
	HCoV-NL63	Amsterdam I	2×10 ⁹ copies	-	-		B/NIID/2474/14	5 ×10 ⁴ copies	-	-
		Tokyo/SGH-15/2017	7.5×10 ⁶ copies	-	-	Human metapneumovirus	IA10-2003	1.0×10 ⁵ copies	-	-
		Tokyo/SGH-24/2018	2.0×10 ⁴ copies	-	-	(hMPV)	Sendai/0256/2015	5.0×10 ⁴ copies	-	-
	HCoV-OC43	VR-1558	5.1×10 ¹⁰ copies	-	-		Sendai/414/2013	2.0×10 ² copies	-	-
		Tokyo/SGH-36/2014	6.8×10 ⁷ copies	-	-		Sendai/1052/2011	3.4×10 ⁵ copies	-	-
		Tokyo/SGH-61/2014	3.3×10 ⁸ copies	-	-	coronaviruses (ADV)				
		Tokyo/SGH-06/2015	1.1×10 ⁸ copies	-	-	ADV 3	G.B.	7×10 ⁵ TCID ₅₀	-	-
		Tokyo/SGH-65/2016	2.9×10 ⁸ copies	-	-	ADV 4	RI-67	7×10 ⁵ TCID ₅₀	-	-
	HCoV-HKU1	Tokyo/SGH-15/2014	5.7×10 ⁷ copies	-	-	ADV 7	Gomen	7×10 ⁵ TCID ₅₀	-	-
		Tokyo/SGH-18/2016	6.3×10 ⁸ copies	-	-					
influenza viruses										
	H1N1pdm	A/California/7/2009	1×10 ⁵ copies	-	-					
	H3N2	A/Victoria/210/2009	8.4×10 ⁴ copies	-	-					
	B	B/Brisbane/60/2008	4.2×10 ⁵ copies	-	-					
parvoviruses										
human respirovirus 1 (PIV1)		C-35	1.1×10 ⁵ copies	-	-					
		NIID/79081/1/2019	1.3×10 ⁶ copies	-	-					
		NIID/79082/2/2019	5.1×10 ⁶ copies	-	-					
human respirovirus 3 (PIV3)		C-243	9.3×10 ⁵ copies	-	-					
		NIID/79133/1/2019	4.1×10 ⁵ copies	-	-					
human Rubulavirus 2 (PIV2)		NIID/56606/2/2019	7.3×10 ² TCID ₅₀	-	-					
		NIID/56607/1/2019	7.3×10 ¹ TCID ₅₀	-	-					
noviruses										
Human orthopneumovirus		Long	5.7×10 ⁴ copies	-	-					
parainfluenza virus, RSV)		A2	2.5 ×10 ⁶ copies	-	-					
		CH/18537	4.8×10 ⁵ copies	-	-					

交差反応はない

S2 セットの Practicality

No.	Detection result	Specimen type	(Cp value)	
			NIID-N2 set	NIID-S2 set
1	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
2	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
3	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
4	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
5	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
6	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
7	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
8	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
9	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
10	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
11	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
12	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
13	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
14	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
15	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
16	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
17	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
18	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
19	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
20	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
21	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
22	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
23	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
24	Not detected	Pharyngeal swab	-	-
25	Not detected	Nasal swab	-	-
26	Not detected	Sputum	-	-
27	Not detected	Sputum	-	-
28	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	23.3	24.15
29	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	25.1	25.87
30	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	27.4	28.15
31	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	29.7	30.57
32	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	29.7	30.46

33	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	28.9	30.43
34	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	30.5	32.16
35	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	32.7	33.54
36	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	35.9	36.14
37	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	36.2	38.53
38	SARS-CoV-2	Nasopharyngeal swab	34.9	35.0
39	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	33.7	33.9
40	SARS-CoV-2	Pharyngeal swab	28.7	28.1
41	SARS-CoV-2	Sputum	22.5	28.1
42	ADV C	Nasopharyngeal swab	-	-
43	ADV C	Nasopharyngeal swab	-	-
44	hMPV	Nasopharyngeal swab	-	-
45	hMPV	Nasopharyngeal swab	-	-
46	Influenza A	Nasopharyngeal swab	-	-
47	Influenza A	Nasopharyngeal swab	-	-
48	PIV1	Nasopharyngeal swab	-	-
49	PIV1	Nasopharyngeal swab	-	-
50	PIV2	Nasopharyngeal swab	-	-
51	PIV2	Nasopharyngeal swab	-	-
52	PIV3	Nasopharyngeal swab	-	-
53	PIV3	Nasopharyngeal swab	-	-
54	RSV A	Nasopharyngeal swab	-	-
55	RSV B	Nasopharyngeal swab	-	-
56	RSV A	Nasal swab	-	-
57	RSV B	Nasal swab	-	-


臨床検体の検出結果もN2と一致

S2 セットの陽性コントロール

CAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGT
GCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCA
ACAATTAATTAGAGCTGCAGAAATCAGAGCTTCTGCTAATCTTGCTGCTACTAAAATG
TCAGAGTGTGTACTTGGACAATCAAAAAGAGTTGATTTTTGTGGAAAGGGCTATCAT
CTTATGTCCTTCCCT**CAGTCAGCACCTCATGGTGTAG**GGATCCAGCTAGCGCATTGG
ATCTCGGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGAACTTCACAAC**TGCTCCTGC**
CATTTGTCATGATGGAAAAGCACACTTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGTT**CAAATGG**
CACACACTGGTTTGTAACACAAAGGAATTTTTATGAACCACAAATCATTACTACAGAC
AACACATTTGTGTCTGGTAACTGTGATGTTGTAATAGGAATTGTCAACAACACAGTTT
ATGATCCTTTGCAACCTGAATTAGACTCATTCAAGGAGGAGTTAGATAAATATTTTA

574b

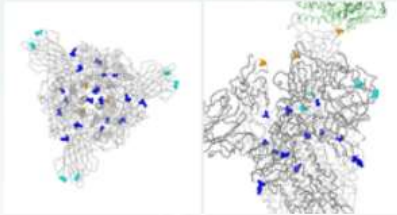
N2セット、S2セットのprimer/probe領域における変異検索

Login🔍
About us Database Features Events Collaborations References Registration Help

In Focus

UK reports new variant, termed VUI 202012/01

The United Kingdom reported a new variant, termed VUI 202012/01 (Variant Under Investigation, year 2020, month 12, variant 01). It was defined by multiple spike protein mutations (deletion 69-70, deletion 144-145, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H). There are currently 24,746 viruses from the UK in GISAID EpiCoV with a collection date since 1. November. A small fraction of them, about 6% (all from clade GR) share several of these mutations.



3D structural position of multiple spike protein mutations


As seen on many occasions before, mutations are naturally expected for viruses and are most often simply neutral regional markers useful for contact tracing. The mutations seen have rarely been affecting viral fitness and almost never affect clinical outcome but the detailed effects of these mutations remain to be determined fully.

[> read more](#)

● ● ● ● ● ● ● ●


Genomic epidemiology of hCoV-19

Showing 117 of 119 genomes sampled between Dec 2019 and Feb 2020



Diversity

COVID-19 Global Cases




Enabled by hCoV-19 data from GISAID+

European Commission (Belgium)
Performance database for diagnostic medical devices related test methods for COVID-19

Sequence Analysis Pipeline

hCoV-19 Data Sharing via GISAID



275k
submissions

Time	Submissions
Start	35,053
...	57,430
...	79,351
...	92,080
...	151,417
End	274,650

Recent hCoV-19 Data Submissions

- [hCoV-19/BurkinaFaso/4312/2020](#)
- [hCoV-19/France/CVL-IPP9554/2020](#)
- [hCoV-19/Jordan/AM-ALSR-4098/2020](#)

Search

Accession ID Virus name complete high coverage
 Location Host low coverage excl w/Patient status
 Collection to Submission to
 Clade Lineage Mutation

<input type="checkbox"/>	Virus name	Passage de	Accession ID	Collection dat	Submission C	<i>i</i>	Length	Host	Location	Originating lab
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/Brazil/SP-735/2020	Original	EPI_ISL_693248	2020-07-06	2020-12-10		29,874	Human	South America / E	Centro Mur
	Registered sequncenes		256429							
	Available sequences		192325							
	Euro		117200							
	United Kingdom		85085							
	North America		39501							
	USA		36562							
	South America		1585							
	Asia + Middle East		18191							
	Japan		9385							
	Oceania		13185							
	Australia		12471							
	Africa		2593							

12/10

半数近くがEuroで、ほとんど英国
英国とアメリカからの登録が60%

登録数が100を超える変異

NIID-N2 set	Sequence (5' to 3')
NIID_2019-nCOV_N_F2	AAATTTTGGGGACCA T GAAC
N2F_G16T	AAATTTTGGGGACCA T GAAC
N2F_C20T	AAATTTTGGGGACCA T GAAC
NIID_2019-nCOV_N_R2ver3	TGGCACCTGTGTAGGTCAAC
N2Rver3_G9A	TGGCACCT A TGTAGGTCAAC
N2Rver3_G11T	TGGCACCTGT A TAGGTCAAC
NIID_2019-nCOV_N_R2_C6G (Ver.1)	TGGCA G CTGTGTAGGTCAAC
NIID_2019-nCOV_N_P2	ATGTCGCGCATTGGCATGGA
N2P_G6T	ATGTC T CGCATTGGCATGGA
NIID-S2 set	Sequence (5' to 3')
SARS-CoV2_NIID_S_F1	CAGTCAGCACCTCATGGT G T
S2_F1T18C	CAGTCAGCACCTCATGG C GTA ←登録68
SARS-CoV2_NIID_S_R3	AACCAGTGTGTGCCATTTGA
S_R3_T9C	AACCAGT G CGTGCCATTTGA
SARS-CoV2_NIID_S_P2	TGCTCCTGCCATTTGTCATGATGG
S_P2_G2T	T TCTCCTGCCATTTGTCATGATGG
S_P2_G20T	TGCTCCTGCCATTTGTCAT T ATGG
S_P2_T22C	TGCTCCTGCCATTTGTCATGA C GG

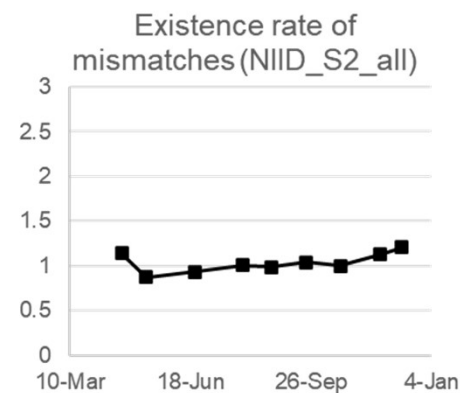
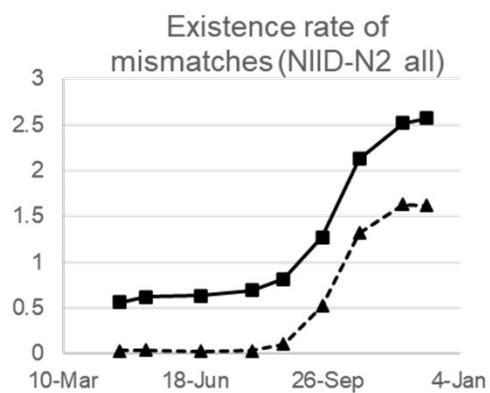
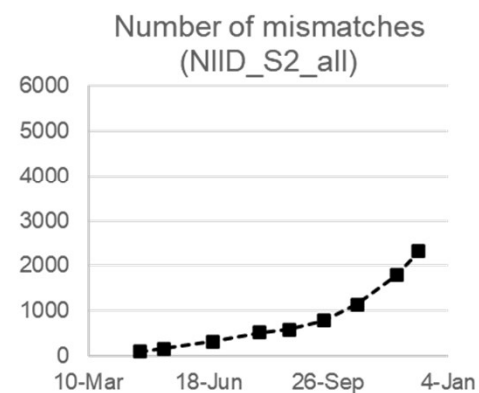
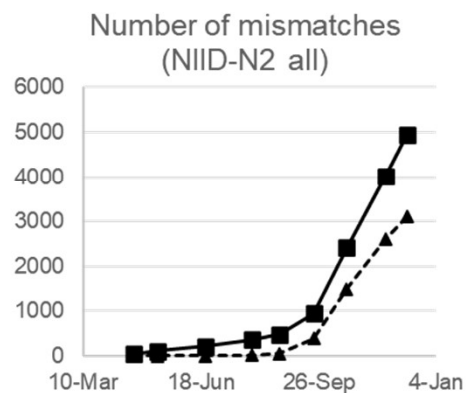
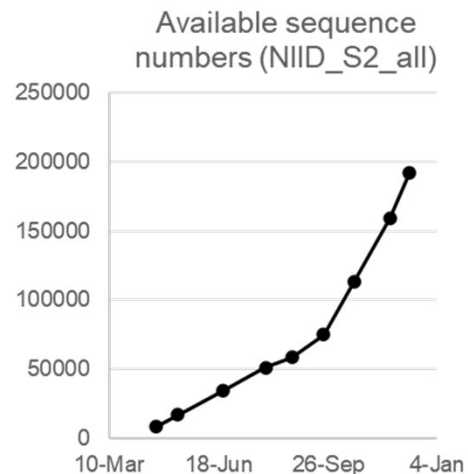
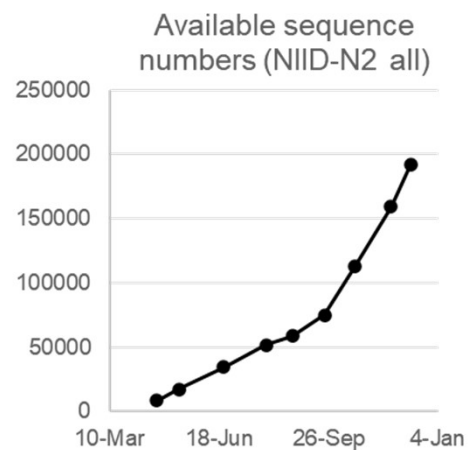
ミスマッチの数と割合

Nが含まれる配列
は除いて解析

NIID-N2 set	All	Existence rate (%)	Japan	Existence rate (%)
Available sequences	192028		9385	
Mismatches	4933	2.57	55	0.59
N2F_G16T	129	0.07	4	0.04
N2F_C20T	325	0.17	36	0.38
N2Rver3_G9A	348	0.18	4	0.04
N2Rver3_G11T	123	0.06	1	0.01
N2P_G6T	3105	1.62	1	0.01

NIID-S2 set	All	Existence rate (%)	Japan	Existence rate (%)
Available sequences	192237		9385	
Mismatches	2321	1.21	27	0.29
S_R3_T9C	376	0.20	1	0.01
S_P_G2T	252	0.13	11	0.12
S_P_G20T	319	0.17	0	0.00
S_P_T22C	476	0.25	0	0.00

ミスマッチ 登録の経時的変化



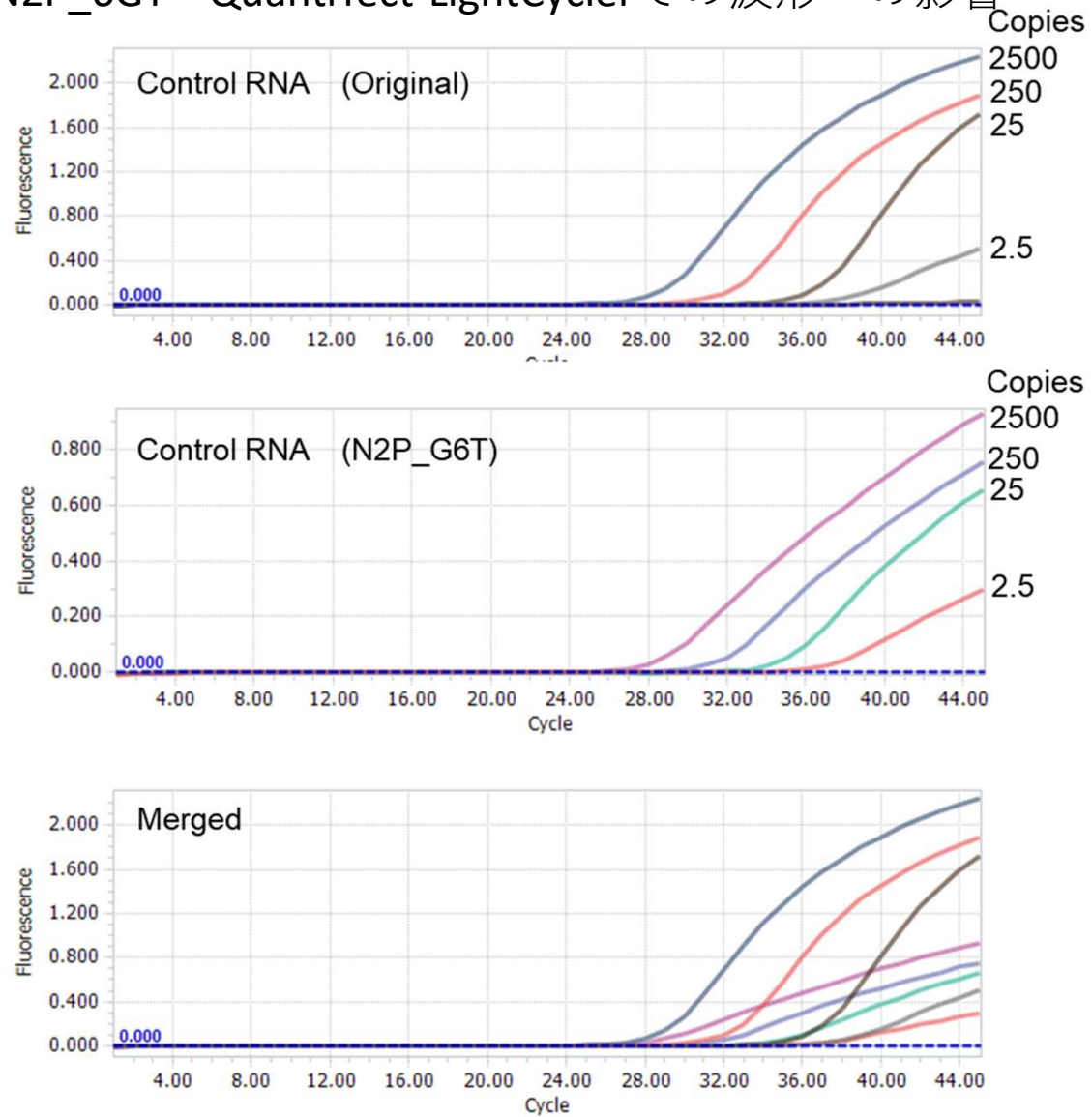
N2P_G6T登録の増加に伴いN2のミスマッチ率も増加

ミスマッチ(シングル)の検出感度への影響 (合成RNAでの評価)

Sensitivities (copies/reaction)		Primer/Probe set		
		N2 (Ver.3)	N2 (Ver.1)*	N2F_C20T**
Control template	N2 original (Ver.3)	2.6	4.5	
	N2F_G16T	2.5		
	N2F_C20T	59.3		1.4
	N2Rver3_G9A	4.4		
	N2Rver3_G11T	4.4		
	N2P_G6T	0.8		
		S2		
Control template	S2 original	1.1		
	S2_R3_T9C	1.4		
	S2_P2_G2T	0.8		
	S2_P2_G20T	0.8		
	S2_P2_T22C	2.5		
	S2_F1T18C	7.9	S2_F1T18Cのプライマーで	2.5 コピー

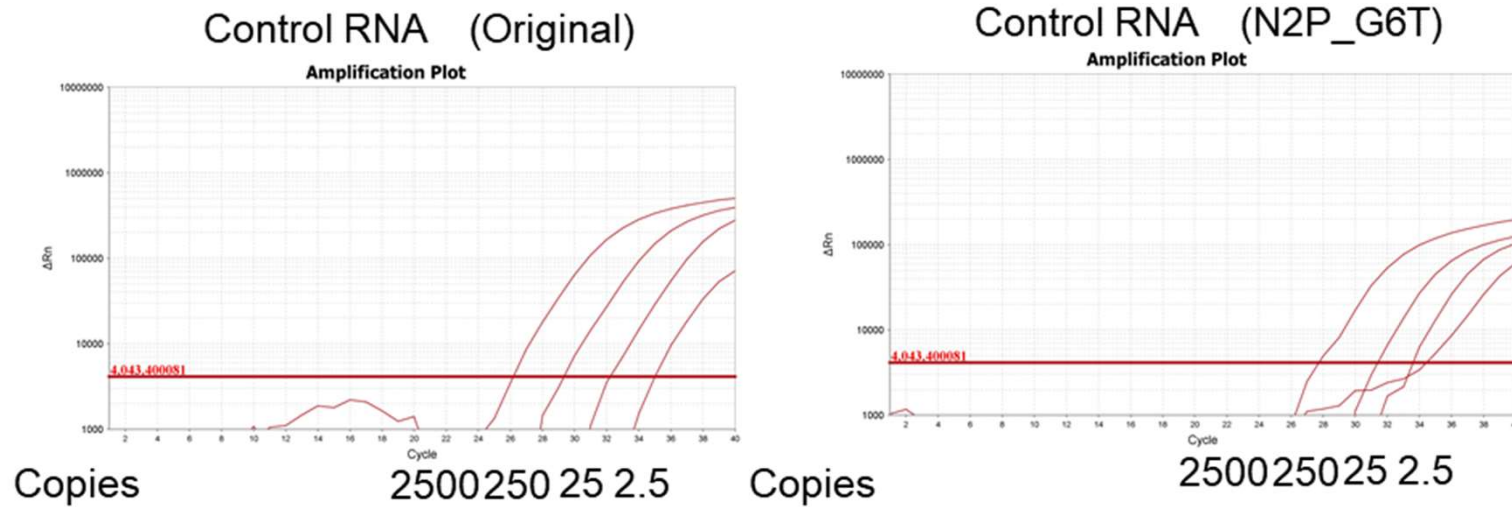
N2のFの3末における変異以外は特に影響は見られない。
3末は40倍ほど感度が下がるが検出できなくなるわけではない。

N2P_6GT QuantiTect-LightCyclerでの波形への影響



N2P_G6T変異により蛍光値が下がり、波形が寝る傾向がある

N2P_6GT QS5でのCtへの影響



N2P_G6T変異にCtが上昇する傾向にある。
オートで値が取れない場合は高めの閾値で判定することになる

	Number of sequences
N2F_C20T	325
Hong Kong	68
England	44
USA	41
Japan	36
Denmark	27
Spain	26
Australia	19
Costa Rica	19
Portgul	14
Other	31

N2F_C20T変異はスペイン・ポルトガルが発祥と思われるが、すでに世界中に拡散している

	Number of Sequences
N2P_G6T	3105
England	2401
Scotland	411
Wales	207
Northern Ireland	5
Denmark	26
USA	26
Australia	4
Russia	4
Japan	3
The Netherlands	3
Spain	2
Other	13

N2P_G6T変異は97.4%が英国からの登録だが、他国からも登録がある。

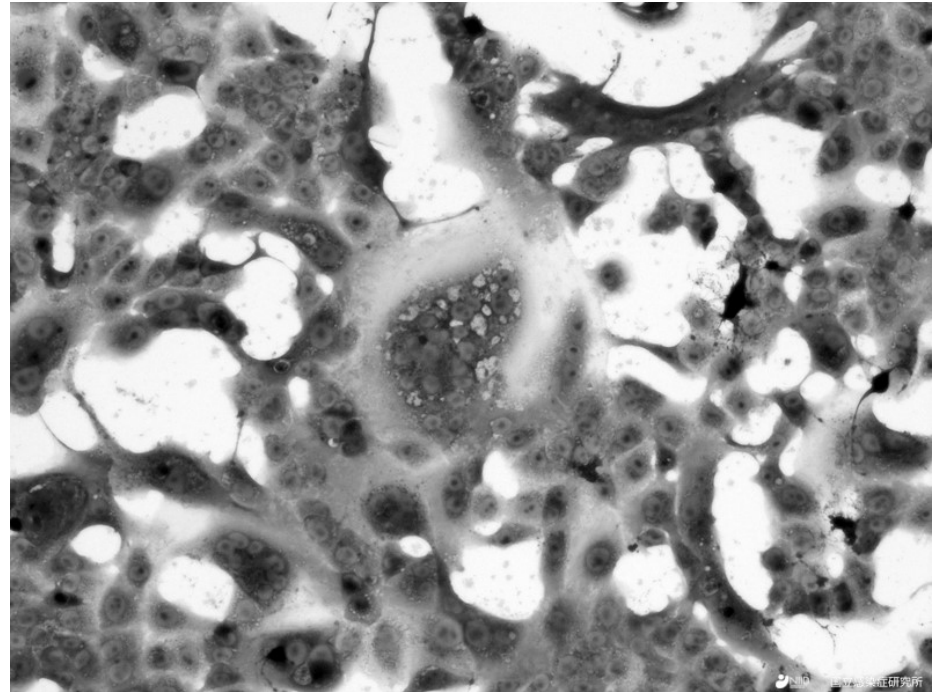
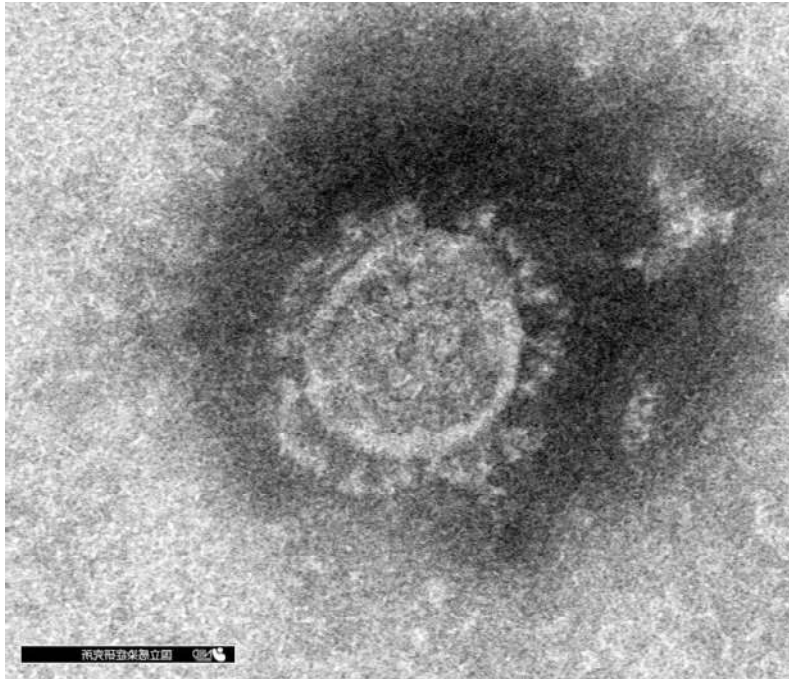
SARS-CoV-2検出マニュアルVer.1

病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver.4

- ・ N2セットはまだ十分に使える性能であると思われるが、S2によるサポートがあればより安心(Nでも可)。

ウイルス分離について

VeroE6/TMPRSS2 (ウイルス3部 田原舞乃先生)



室長の松山が1月末に分離成功

現在のところ病原体サーベイランスを行う事にはなっていない。
積極的疫学調査におけるゲノム情報解析がこれに相当している。
将来的に導入される可能性に備えるために掲載 (これも6月頃に追加予定だった。)

[細胞検索](#)
[細胞情報](#)
[受託業務](#)
[培養細胞寄託案内](#)
[JCRB細胞バンクについて](#)
[その他](#)
JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2 [Order](#)
細胞情報

JCRBからマイコプラズマ除去済みのクローンを入手可能

Important Notice(s)
[On the commercial use of Vero/TMPRSS2](#)
[Mycoplasmal contamination --> confirmed the elimination of mycoplasmas / マイコプラズマ感染に関して VeroE6/TMPRSS2 --> 完全に除染を確認](#)
[About the exportation of VeroE6/TMPRSS2 - CITES regulated cell line -](#)
[To customers in Europe \[VeroE6/TMPRSS2\]](#)
[細胞種類：ワシントン条約規制対象細胞株\(遺伝子改変\) \(細胞分譲手数料はこちら\)](#)

細胞番号(JCRB)	JCRB1819	細胞名	VeroE6/TMPRSS2
生物種(日本語)	アフリカミドリザル	組織名(日本語)	腎臓
コメント(日本語)	Transmembrane Serine Protease TMPRSS2発現VeroE6細胞株, MERS (中東呼吸器症候群) コロナウイルス高感受性, 国立感染症研究所において新型コロナウイルスの分離に成功 (2020年1月31日発表)	プロフィール	VeroE6 cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2.
別名		動物名	monkey, African green
系統名		学名・属名	Chlorocebus
種名	sabaeus	性別	F
年齢・月齢		細胞識別情報	
(癌) 原発組織名		病歴情報	
転移の有無 (Y/N)		(癌) 転移組織名	
遺伝的性質	Cells were transfected with pAP3neo encoding human TMPRSS2 (plasmid vector)	細胞寿命	infinite

ホーム > 細胞検索 > 細胞検索結果一覧

細胞検索結果一覧

検索文字 [Keyword]=TMPRSS2

[+ 検索語句詳細\(類義語リスト\)](#)

[+ 絞り込み検索](#)

近いうちにHeLa-ACE-2-TMPRSS2も分譲可能に
(HCoV(229E, NL63), SARS-CoV, SARS-CoV-2)

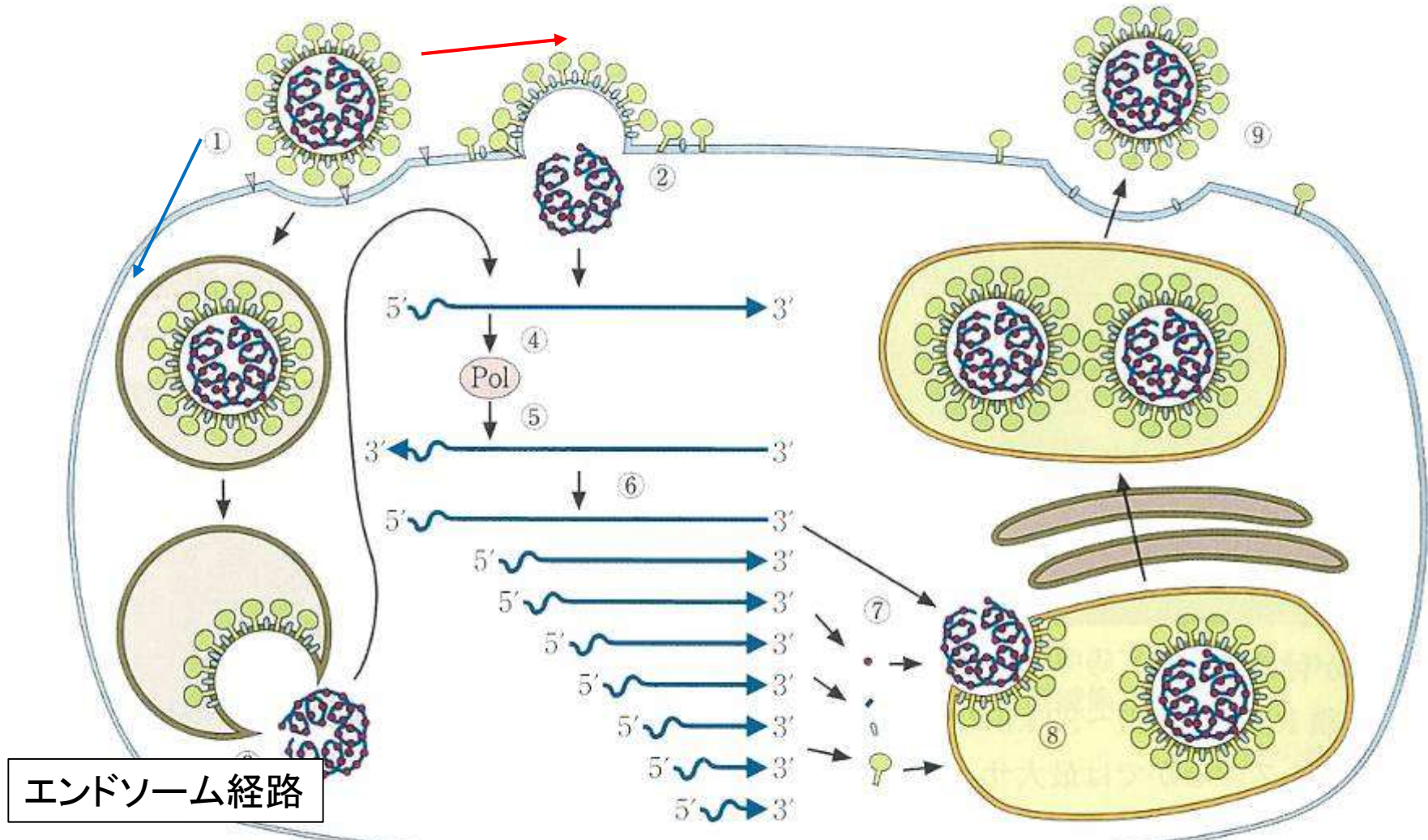
1 - 2 件表示 / total 2 件

[細胞分譲手数料はこちら](#)

Order	細胞種類	細胞登録番号 ↓ ↑	細胞名 ↓ ↑	由来種 ↓ ↑	組織名	コメント	プロフィール
Order	遺伝子改変細胞	JCRB1818	Vero/TMPRSS2 MERS-CoV	アフリカミドリザル	African green monkey	Transmembrane Serine Protease TMPRSS2発現Vero細胞株, MERS (中東呼吸器症候群) コロナウイルス高感受性	Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2.
Order	ワシントン条約規制対象細胞株 (遺伝子改変)	JCRB1819	VeroE6/TMPRSS2 SARS-CoV SARS-CoV-2	アフリカミドリザル	腎臓	Transmembrane Serine Protease TMPRSS2発現VeroE6細胞株, MERS (中東呼吸器症候群) コロナウイルス高感受性, 国立感染症研究所において新型コロナウイルスの分離に成功 (2020年1月31日発表)	VeroE6 cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2.

呼吸器感染するコロナウイルスは自然界ではこちらの経路を使うのが普通
細胞侵入速度が速く、プロテアーゼのおかげでCPEの切れもいい。

細胞表面経路 (細胞外プロテアーゼが必要)



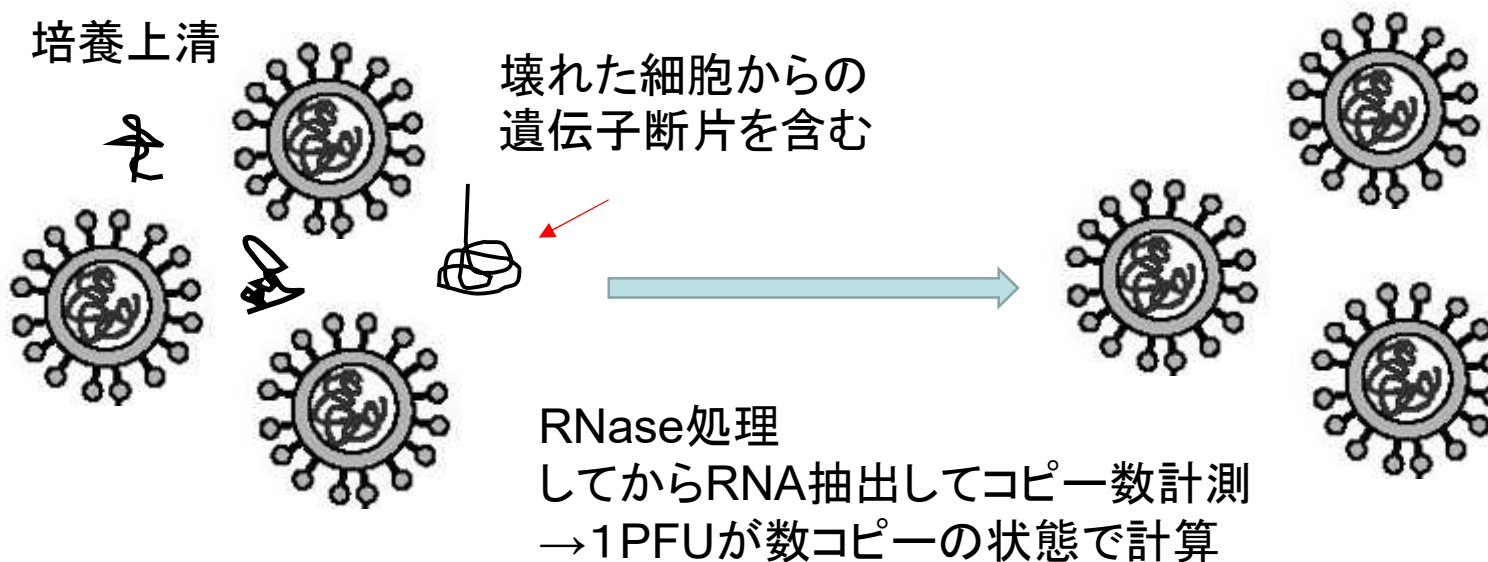
培養細胞で長く継代しているところを使うようになる。
細胞侵入速度も遅く、CPEもわかりづらい

VeroE6/TMPRSS2でSARS-CoV-2を分離するには、おおよそ100コピー必要と言われる

MERS-CoVをVeroとVero/TMPRSS2で模擬分離したときのデータ
(咽頭スワブに希釈したウイルスを混ぜて分離をした)

Copies/50 μ l	500000	50000	5000	500	50	5	0.5	Negative control	Sensitivity(copies)	Time required
Virus isolation*										
Vero	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	500	5 days
Vero/TMPRSS2	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	0/6	0/6	0/6	23.2	2 days

Virology J . 2014 Aug 8;11:139.p doi: 10.1186/1743-422X-11-139.





QIAamp Viral RNA mini kit

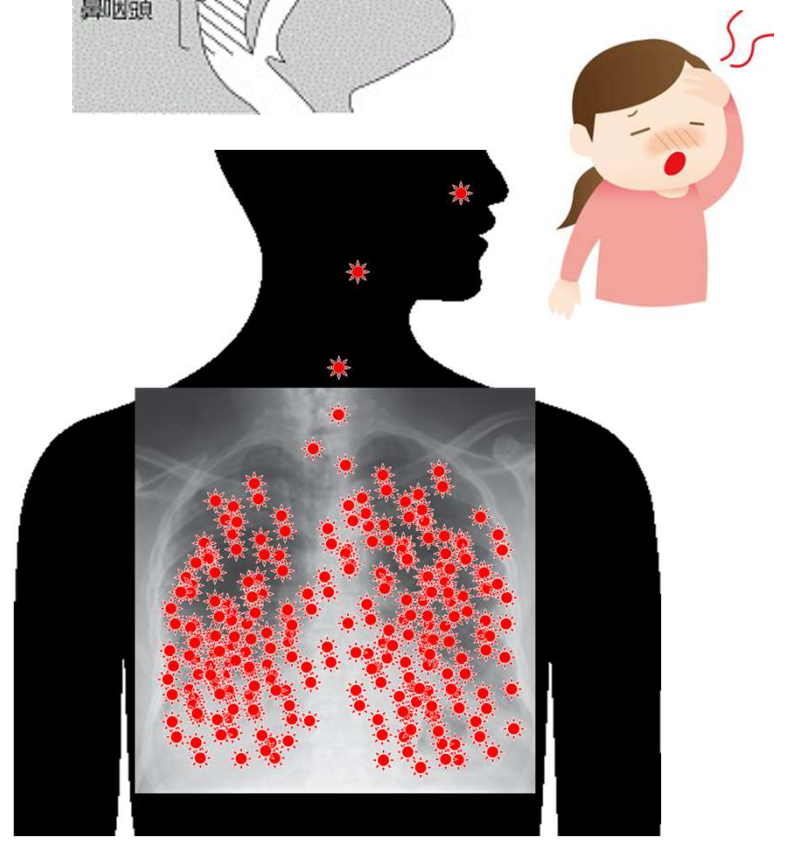
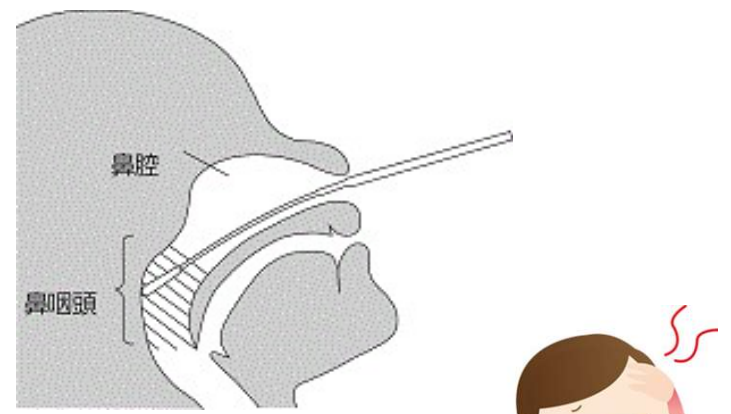
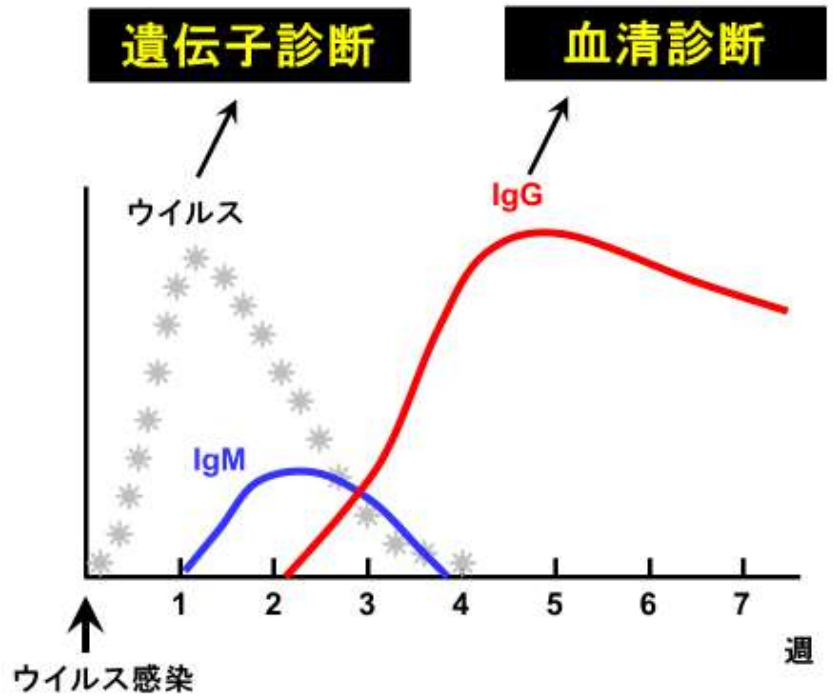
検体140uLから60uLに溶出
1反応に5uL使用

→ 1反応あたり**11.7uL**の検体を含む

ウイルス分離の成功率を上げるためには1反応あたりのコピー数を計算し、VeroE6/TMPRSS2細胞におおむね100コピーが投入できる検体量を接種するのが望ましい。

最後に

一般的な時間経過



PCR検査でわかることは取ったその検体中に検出限界以上の遺伝子断片があるかないか、のみ

12月2日
読売新聞

そもそも96ウェルプレートで水をかけて1ウェル上がるような状態で検査するほうがおかしい。

系が悪いか環境が悪いのどちらか

東京五輪・パラリンピックの新型コロナウイルス対策で、症状がないのに検査で陽性になった選手について、大会組織委員会が直ちに再検査を行う方針であることがわかった。陰性なのに陽性と判定される「偽陽性」の恐れがあるため、誤った診断で出場機会を奪うのを避ける狙い。2日の政府のコロナ対策調整会議で正式決定する。

「偽陽性で不出場」防げ

五輪・パラ

無症状すぐ再検査 組織委方針

東京五輪・パラリンピックの新型コロナウイルス対策で、症状がないのに検査で陽性になった選手について、大会組織委員会が直ちに再検査を行う方針であることがわかった。陰性なのに陽性と判定される「偽陽性」の恐れがあるため、誤った診断で出場機会を奪うのを避ける狙い。2日の政府のコロナ対策調整会議で正式決定する。

きょう正式決定
大会関係者によると、感染が広がるのを防ぐため、選手には定期的な検査を実施する。出国前と入国時に加え、入国から96〜120時間の間後や、選手村（東京都中央区）に入る際などを検査の回数や時期が変わる可能性があるという。陽性となった場合、せきや高熱などの症状があれば、入院や療養施設での待機を求める。だが、無症状であれば、偽陽性の可能性が排除できないため、選手を直ちに検査施設での待機で、直ちに検体を二つとって再び行う。一つでも陽性でも陽性と判断、陰性いずれも偽陽性と判断。

組織委が検討する検査のイメージ



中央区）に入る際などを検査の回数や時期が変わる可能性があるという。陽性となった場合、せきや高熱などの症状があれば、入院や療養施設での待機を求める。だが、無症状であれば、偽陽性の可能性が排除できないため、選手を直ちに検査施設での待機で、直ちに検体を二つとって再び行う。一つでも陽性でも陽性と判断、陰性いずれも偽陽性と判断。

組織委は11月、国際オリンピック委員会（IOC）などに対し、再検査は選手一人につき2検体を調べ、一つでも陽性なら、無症状であっても陽性と診断を確定する案を示した。今後、陽性者や濃厚接触者の出場可否を含め、国内

東海大の宮地勇人教授（64）（臨床検査学）に、五輪で採用される予定の検査について聞いた。

ウイルスの遺伝子配列を確認するPCR検査で、感染していない人を誤って陽性と判定してしまう「偽陽性」となる確率は、一般的に約1％。多くの場合、検査機関で、ほかの陽性の検体が混ざるなどして起こる。

PCRとともに大会で採用される予定の装置を使った抗原検査は、ウイルスを構成す

確率1％でも…

誤判定 100人超の恐れ

東大会には1万数千人の選手が参加するため、PCR検査を行えば、単純計算で100人以上に偽陽性が出る恐れがある。宮地教授は、「適切な手順で、複数回の検査や、陽性後の再検査を行えば、誤判定する可能性はかなり低くなる」と指摘した。

